(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平11－326275

(43)公開日　平成11年(1999)11月26日

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	ＦＩ	
Ｇ０１Ｎ　27/447		Ｇ０１Ｎ　27/26	３３１Ｈ

審査請求　未請求　請求項の数４　ＯＬ　（全５頁）

(21)出願番号　特願平10－140833

(22)出願日　平成10年(1998)５月22日

(71)出願人　000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目６番地

(72)発明者　入江　隆史
東京都国分寺市東恋ケ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内

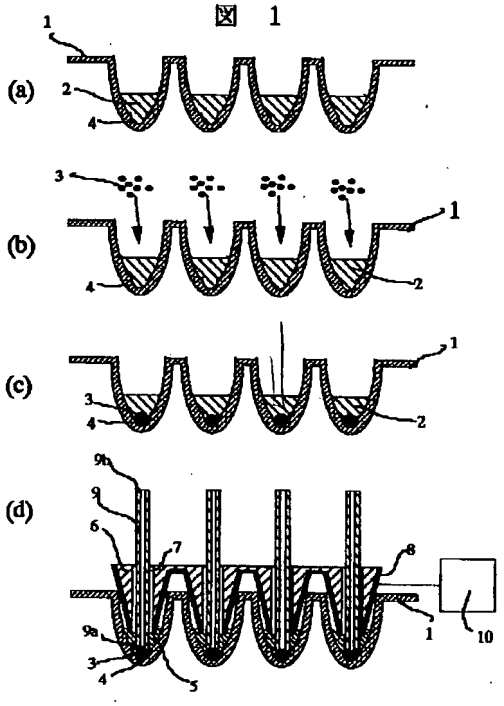
(72)発明者　神原　秀記
東京都国分寺市東恋ケ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人　弁理士　小川　勝男

(54)【発明の名称】　キャピラリー電気泳動に用いる試料注入装置

(57)【要約】
【課題】　少量の試料を効率良く導入できるキャピラリー電気泳動用の試料注入装置を提供する。
【解決手段】　溶液中で、キャピラリー先端９ａに配置した電極８近傍に試料分子を電気泳動させるか、又は、試料を固定した微粒子３を集積して、試料をキャピラリーの先端付近に濃縮し、電界注入によりキャピラリー内部に注入する。
【効果】　試料量を低減でき分析コストの低減ができる。

図　1



1

【特許請求の範囲】

【請求項１】キャピラリー管の両端をそれぞれ電解質を含む溶液中に浸し、前記キャピラリー管の両端間に電圧を与え、前記キャピラリー管の一端から他端へ試料を電気泳動させて成分毎に分離するキャピラリー電気泳動装置に用いる試料注入装置に於いて、前記キャピラリー管の試料注入側の端の近傍に前記試料を濃縮する手段を有することを特徴とする試料注入装置。

【請求項２】請求項１に記載の試料注入装置に於いて、前記試料を濃縮する手段は、前記試料を含む溶液中に分散した微粒子に前記試料を吸着させた後、前記試料注入側の端面の近傍に前記微粒子を集積することを特徴とする試料注入装置。

【請求項３】請求項２に記載の試料注入装置に於いて、前記微粒子に予め反応の前駆体を固定しておき、前記溶液中での反応による生成物を前記微粒子の表面上に生成した後に、前記試料を濃縮する手段は、前記試料注入側の端面に近傍に前記微粒子を集積することを特徴とする試料注入装置。

【請求項４】請求項１に記載の試料導入装置に於いて、前記試料を濃縮する手段は、前記キャピラリー管の先端に設けた電極を用いて、前記試料を電気泳動させて濃縮することを特徴とする試料導入装置。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明はキャピラリー電気泳動装置に関わり、特に微量の試料の解析に好適な構造を有する試料注入装置を提供する。

【０００２】

【従来の技術】従来、キャピラリー電気泳動装置への試料注入は、図４に示すような構成で行われていた。即ち、キャピラリー３１の一端面３１ａを試料を溶解した電解質溶液３３に、他端面３１ｂを電解質溶液３４に挿入し、電極３５、３６をそれぞれ溶液３３、３４に挿入し、電極３５と３６との間に電源３２で電圧を印加して、キャピラリーの端面３１ａと電極３５の間に生じた電位勾配で試料を移動させ、キャピラリーの内部に試料を注入する方式である。キャピラリーの内部に注入された試料分子は、キャピラリー３１内を電気泳動させた後、紫外線ランプ３７と検出器３８を用いた吸光光度測定等によって検出される（例えば、生物物理、第３１巻、１号、３０頁－３３頁（１９９１年））

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】従来法では、実際にキャピラリーに注入される試料量に比べて、試料溶液の量が多く必要であるという問題があった。例えば、内径０．１mmのキャピラリーを用いた場合、実際にキャピラリーに注入される試料量は、数１０ナノリットル程度であるのに対し、注入の際には少なくとも１マイクロリットル程度の溶液を必要とする。従って、準備した試料

2

溶液の内、１００分の１程度しか実際の分析には使用されないため不経済であるという問題があった。

【０００４】本発明の目的は、少量の試料を効率良く導入できるキャピラリー電気泳動用の試料注入装置を提供することにある。

【０００５】

【課題を解決するための手段】上記の問題は、試料注入の際の電極とキャピラリーの配置に起因している。即ち、試料注入時には、試料溶液に外径０．２mm（内径０．１mm）程度のキャピラリーの先端とＰｔ等の細線からなる電極の先端とを同時に浸し、両者の間に電圧を印加するが、再現性よく所定の電圧を印加するには、機械的精度の制約から、１辺の寸法として１mm程度、即ち、液量として１マイクロリットル程度は必要となり、液量を減らすこと、即ち、試料量を節約することは困難である。即ち、液量数１０ナノリットルの溶液に電極とキャピラリーを同時に浸して配置することは、機械的精度の制約から困難である。この問題を解決するために、試料を均質な溶液として準備するのではなく、本発明では、キャピラリー先端付近に試料を濃縮する。

【０００６】本発明では、表面に試料分子を固定できる微粒子を用い、微粒子に試料を固定した後微粒子を液中でキャピラリーの先端付近に配置する。担体からの試料の溶出は、バッファの化学的作用や光等の作用を利用できる。試料分子のバッファ中での拡散係数は、ＤＮＡ等の高分子の場合、約10^{-7} cm^2／秒であるため、均一な温度で静止した液中に於ける試料分子の拡散距離は、１００秒で約０．０１mmに過ぎず、キャピラリーの外形寸法よりも小さい。従って、予め試料をキャピラリーの先端付近に濃縮しておけば、液量が大量であっても、試料は拡散することなく、キャピラリーの先端面付近に高濃度に滞留するため、効率の良い試料注入が可能である。

【０００７】本発明の試料注入装置は、キャピラリー管の両端をそれぞれ電解質を含む溶液中に浸し、キャピラリー管の両端間に電圧を与え、キャピラリー管の一端から他端へ試料を電気泳動させて成分毎に分離するキャピラリー電気泳動装置に用いる試料注入装置に於いて、キャピラリー管の試料注入側の端の近傍に試料を濃縮する手段を有し、試料を濃縮する手段は、試料を含む溶液中に分散した微粒子に試料を吸着させた後、試料注入側の端面の近傍に微粒子を集積する構成とする。また、試料を濃縮する手段は、キャピラリー管の先端に設けた電極を用いて、試料を電気泳動させて濃縮するする構成とする。更に、上記微粒子に予め反応の前駆体を固定しておき、溶液中での反応による生成物を微粒子の表面上に生成した後に、試料を濃縮する手段は、試料注入側の端面に近傍に微粒子を集積する構成とする。

【０００８】

【発明の実施の形態】（第１の実施例）図１は、第１の

実施例の試料注入装置の構成を示す断面図である。容器１に反応液２を入れ、サーマルサイクラー等の反応装置（図示せず）を用いて反応を行う。例えば、ＤＮＡの塩基配列を解析する場合、ビオチンを付加したプライマーを用いてシーケンス反応を行い、ビオチンの付加したＤＮＡ断片を生成する（図１（ａ））。容器１にアビジンの付着した微粒子３、例えば、磁気ビーズ、アガロース粒子、ガラス粒子等を入れ、アビジンとビオチンの特異的結合を利用して、ビオチンの付加したＤＮＡ断片を固定する（図１（ｂ））。図１（ａ）、図１（ｂ）に示す過程では、シーケンス反応に用いるプライマや鋳型ＤＮＡを予め微粒子３に固定しておき、しかる後にシーケンス反応を行うことで、微粒子３の表面上でＤＮＡ断片を生成する方法にも使用できる。即ち、微粒子に予め反応の前駆体を固定しておき、溶液中での反応による生成物を微粒子の表面上に生成した後に、試料注入側の端面に近傍に微粒子を集積する。次いで、遠心分離器によって担体を容器底部の窪み部４に集め、反応液２を廃棄する（図１（ｃ））。

【０００９】次いで、各容器に電解質を含む溶液５、例えば、ＴＢＥバッファとホルムアミドの混合溶液を入れると、アビジンとビオチンの結合は解離し、ＤＮＡが溶液中に遊離する。しかし、ＤＮＡの溶液中の拡散係数は小さいので、ＤＮＡは容器の窪み部４付近に滞留する。絶縁性の材料からなる支持体６を容器にはめ込み、支持体の穴７からキャピラリー管９を挿入する。支持体の穴は窪み部４と位置合わせされているので、キャピラリー管の先端９ａは、ＤＮＡが高濃度に存在する窪み部４に配置される。

【００１０】この配置で、支持体６の表面に予め形成されている電極８に定電圧電源１０を用いて電圧を加える。溶液５の量は予め電極８と接触するのに十分な量にしておく。試料がＤＮＡの場合にはマイナスに帯電しているので、電極８にマイナスの電圧を加え、キャピラリーの他端側９ｂをアース電位にすれば、ＤＮＡをキャピラリーの内部に導入できる（図１（ｄ））。

【００１１】第１の実施例によれば、反応溶液中に薄い濃度で存在する試料を微粒子を用いて濃縮し、キャピラリー先端に配置できるため、効率の良い試料注入が可能になる。また、本実施例では、試料を準備する反応容器を、例えば、マイクロタイタープレート等のように標準的な反応装置に適合する外形形状の容器とし、そのまま試料注入用の容器に用いて、反応からキャピラリーへの試料導入までの工程を容器を交換することなく実行でき、操作が単純化される。

【００１２】（第２の実施例）図２は、第２の実施例の試料注入装置の構成を示す断面図である。板状の部材１１に窪み部１２を設け、窪み部１２の底部には、フィルタ１３が配置されている。反応液２を窪み部１２に入れた後、上下をカバー１４ａ、１４ｂで挟み、ヒートブロック１５上に配置して反応を行う（図２（ａ））。反応後、カバー１４ａ、１４ｂをはずし、微粒子３を各窪み部４に導入し、試料を固定する（図２（ｂ））。

【００１３】次いで、カバー１４ａと部材１６で板状部材１１を挟み、開口部１８から吸引して、反応液２を廃棄する。フィルタ１３の網目は、微粒子３の大きさよりも小さくしておき、微粒子３をフィルタ１３の表面上に残すことができる（図２（ｃ））。

【００１４】次いで、この微粒子３が残った状態の板状部材１１を電解質溶液５に静かに浸し、キャピラリー９の端面９ａを窪み部１２に配置する。キャピラリーの端面９ｂをアース電位とし、電極１９には定電圧電源１０を用いてマイナス電位を与えることにより、微粒子３に固定されていた試料（ＤＮＡ断片）はキャピラリー９の内部に注入される（図２（ｄ））。

【００１５】第２の実施例によれば、窪み部１２とフィルタ１３を高密度に多数配置することにより、集積化が可能である。また、本実施例に於いてフィルタを直接に試料分子の吸着体として用いることもできる。この時、フィルタに予め、例えば、アビジンを付着させておく処理や、反応液２をフィルタに通過させる際（図２（ｃ））に吸引速度を遅くし、固定反応時間を確保する等の処置を施せば良い。

【００１６】（第３の実施例）図３は、第３の実施例の試料注入装置の構成を示す断面図である。キャピラリー管９の端面９ａ付近に電極２１を配置し、試料分子を含む電解質溶液２９中に挿入する。また同じ溶液中に別の電極２２を挿入する。絶縁体２０は電極２１を保持する。絶縁体２０を円筒状として内面に電極を形成した。ガラス細管の内面に電極を形成して使用しても良い。先ず、電極１９と電極２２の間に電圧を引加する。試料がＤＮＡの場合について説明すると、電極２２をアース電位２６（接点２８ａと２８ｂを接続）とし、電極２１をプラス電位（接点２７ａと２７ｂを接続。２３は正電位の定電圧電源。）とする。ＤＮＡ分子は、この電位によって電極２１の周りに濃縮される。次いで、電極２１、及び電極２２をマイナス電位（接点２７ａと２７ｃ、接点２８ａと２８ｃを接続。２４と２５は負電位の定電圧電源。）とすると、ＤＮＡ分子はキャピラリー管内に注入される。以上の一連の操作に於いて、キャピラリーの端面９ｂの電位はアース電位に保持しておく。絶縁体２０は電極２１を保持する部材であり、円筒形状で内面に電極２１を形成している。

【００１７】第３の実施例によれば、電気泳動を利用して、キャピラリー管の端面の周りに高濃度にＤＮＡを濃縮でき、薄い溶液からも効率の良い注入が可能となる。

【００１８】

【発明の効果】本発明によれば、キャピラリーの先端付近に試料分子を濃縮できるので、効率の良い試料注入が可能となり、結果として分析する試料量の低減による分

5

析コスト低減が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明の第１の実施例の試料注入装置の構成を示す断面図。

【図２】本発明の第２の実施例の試料注入装置の構成を示す断面図。

【図３】本発明の第３の実施例の試料注入装置の構成を示す断面図。

【図４】従来技術の装置の一例の構成を示す図。

【符号の説明】

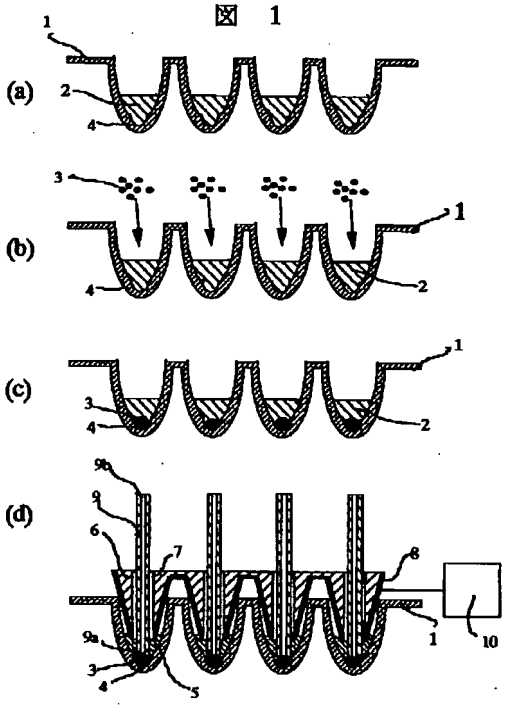
１…反応容器、２…反応液、３…微粒子、４…窪み部、５…電解質溶液、６…支持体、７…穴、８…電極、９…キャピラリー、９ａ…キャピラリーの試料注入側端面、

6

９ｂ…キャピラリーの他端面、１０…定電圧電源、１１…板状部材、１２…窪み部、１３…フィルタ、１４ａ、１４ｂ…カバー、１５…ヒートブロック、１６…部材、１７…吸引される反応液、１８…開口部、１９…電極、２０…絶縁体、２１…電極、２２…電極、２３…定電圧電源（正電位）、２４…定電圧電源（負電位）、２５…定電圧電源（負電位）、２６…アース電位、２７ａ、ｂ、ｃ…接点、２８ａ、ｂ、ｃ…接点、２９…試料分子を含む電解質溶液、３１…キャピラリー、３１ａ…キャピラリーの一端、３１ｂ…キャピラリーの他端、３２…定電圧電源、３３…電解質溶液（試料を含む）、３４…電解質溶液、３５…電極、３６…電極、３７…紫外線ランプ、３８…検出器。

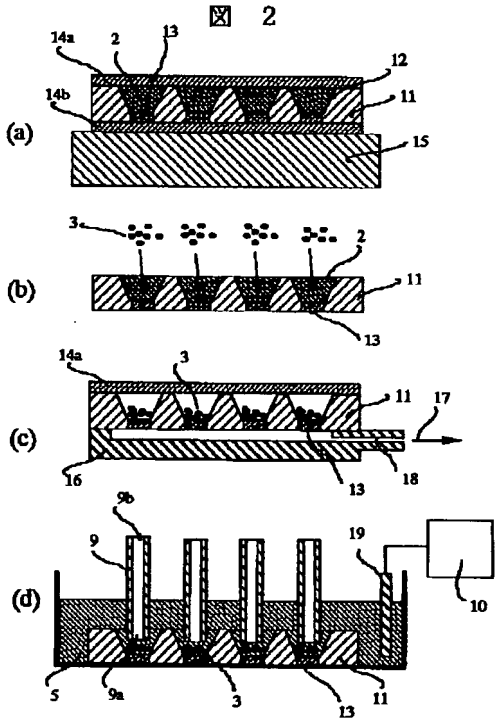
【図１】

図　1



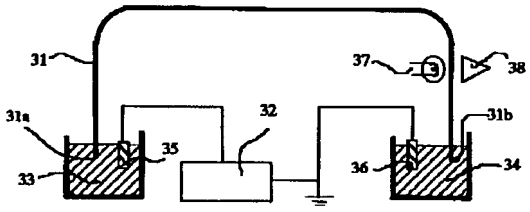
【図２】

図　2



【図４】

図　4



【図3】

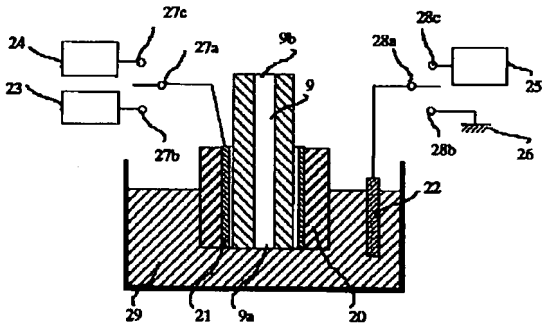



図 3